

## ***Campylobacter jejuni* y *C. coli* en suinos abortados: comparación entre la identificación fenotípica y los perfiles proteicos en geles de poliacrilamida**

G.I. GIACOBONI<sup>1</sup>\*, M.G. ECHEVERRÍA<sup>2</sup>, C.J. PERFUMO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas, <sup>2</sup>Cátedra de Virología, <sup>3</sup>Instituto de Patología B. Epstein, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118, CC 296, La Plata B1900AVW, Argentina.

\*Correspondencia. E-mail: giacoboni@fcv.unlp.edu.ar

### **RESUMEN**

Se aislaron *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* de abortos suinos sucedidos en diferentes establecimientos, entre febrero de 2000 y mayo de 2001. Las bacterias aisladas se identificaron como: *C. jejuni* biotipo II (7), *C. jejuni* biotipo I (3) y *C. coli* biotipo I (1) por las pruebas bioquímicas convencionales y según el esquema de Lior. Para comparar y establecer si hubo diferencias entre las cepas aisladas y caracterizadas fenotípicamente se utilizó el método de electroforesis en geles de poliacrilamida al 7,5, 10 y 12,5%, utilizando células enteras en buffer de reducción. Las proteínas halladas fueron las comunes descritas para esas especies de *Campylobacter* con algunas diferencias de movilidad. Se pudo corroborar la presencia de *C. jejuni* y *C. coli* en fetos de diferentes edades y procedencias y cepas fenotípicamente idénticas pero con diferencias en el patrón proteico en fetos de la misma camada. El método de electroforesis empleado utilizando células completas resultó reproducible y útil para revelar diferencias entre cepas con igual fenotipo, hecho que corrobora la variabilidad de los tipos de *Campylobacter* involucrados en la epidemiología de este género bacteriano.

**Palabras claves:** porcinos, abortos, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, biotipificación, electroforesis de proteínas.

### **SUMMARY**

***Campylobacter jejuni* and *C. coli* from aborted pig fetuses: comparison of phenotypic identification and SDS-PAGE.** *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* were isolated from aborted pig fetuses which proceeded from different animals and farms between February 2000 and March 2001. Seven *Campylobacter jejuni* biotype II, three biotype I and one *Campylobacter coli* biotype I were identified by phenotypic tests and Lior's scheme. To corroborate and compare the phenotypic results, 7.5, 10 and 12.5% polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were used under reducing conditions. Characteristic bands of hypervariable dense zone within *C. jejuni* and *C. coli* species were observed in all the whole cell protein extracts with differences in mobility. It was possible to establish differences between identical phenotypic *Campylobacter* isolates and different protein profile from fetuses of the same litter. SDS-PAGE is a stable and reproducible method to establish differences between *Campylobacter* strains and is considered applicable for the differentiation of the wide variability of *Campylobacter* species for epidemiologic purposes.

**Key words:** pigs, abortion, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, biotyping, SDS-PAGE.

### **INTRODUCCIÓN**

La familia *Campylobacteraceae* comprende un grupo de bacterias Gram negativas que colonizan el tracto intestinal de una amplia variedad de animales domésticos y silvestres (3). Algunas de ellas son comensales y otras son patógenas aso-

ciadas a diversas enfermedades en hombres y animales (18). Las especies denominadas termófilas (*Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) están estrechamente relacionadas por su genotipo (20) y son las que comúnmente producen enteritis y diarrea en humanos. Las especies *C. fetus fetus* y *C. fetus venerealis* causan abortos y problemas

reproductivos en rumiantes (10). En los cerdos las especies *A. cryaerophilus*, *A. butzleri* y *A. skirrowii* del género *Arcobacter* se aislaron de fetos abortados y tracto genital de hembras y machos (14,15). El hallazgo de abortos en cerdos por *Campylobacter* termófilos no está registrado, a diferencia de los ovinos en los que se aislaron diferentes especies de *Campylobacter*, entre ellas *C. jejuni* y *C. coli* (6, 7). Los animales pueden adquirir la infección oralmente a partir de una variada fuente del ecosistema que habitan, agua, suelo, alimento contaminado con las heces de los portadores (8). La identificación fenotípica de campilobacterias suele ser incompleta o inexacta, por considerarlas bacterias con poca actividad bioquímica. La falta de normatización de las pruebas que se utilizan está influenciada por la metodología empleada en cada laboratorio y las consecuencias se evidencian en las discrepancias entre los que las realizan al evaluar los resultados (16). Se han desarrollado otras técnicas para mejorar la identificación de campilobacterias y subtipificarlas; cada una tiene sus ventajas y desventajas, algunas de ellas son, por ejemplo, las pruebas serológicas (17), moleculares (23) y el estudio de las proteínas (12). De acuerdo con Vandamme y col (21) la electroforesis en geles de poliacrilamida es uno de los métodos más apropiados para la identificación y diferenciación de estos organismos. Si bien se pueden obtener diferentes tipos de proteínas según el método de extracción o detección, los perfiles proteicos de la célula entera son los más utilizados en la identificación de bacterias porque aportan una información más completa (17). Así, se observa un patrón de proteínas con una zona densa hipervariable que caracteriza a las especies de *Campylobacter*, de entre 39 y 60 kD que varían en su posición y comprenden algunas proteínas como la porina (40-45 kD) y otras proteínas menores constantes de 27-29, 62-64 –flagelina–, 72 kD y una menor variable de 70-75 kD (13, 21, 26).

El objetivo de este trabajo fue aislar *Campylobacter* termófilos de abortos suinos sucedidos en diferentes establecimientos, tipificarlos por las pruebas bioquímicas convencionales y utilizar el método de electroforesis en geles de poliacrilamida para comparar y establecer si hubo diferencias entre las cepas aisladas y caracterizadas fenotípicamente con fines epidemiológicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

De 8 establecimientos de cría porcina con sistema intensivo y con planes vigentes de vacunación contra enfermedades reproductivas (parvovirus y *Leptospira* spp), se remitieron 75 fetos abortados o nacidos prematuramente (>107 días) entre febrero de 2000 y marzo de 2001. Los órganos procesados para el aislamiento fueron hígado, bazo, intestino y contenido estomacal. Las muestras trituradas y homogeneizadas en medio Cary Blair (22) se sembraron en medio selectivo de Skirrow modificado (9) compuesto por agar Brucella 43 g/l, vancomicina 10 mg/l, trimetoprima 5 mg/l, polimixina B 2.500 U/l, cefalotina 10 mg/l, metabisulfito de sodio 0,5 g/l, piruvato de sodio 0,5 g/l, sulfato ferroso 0,5g/l y sangre estéril ovina 60 ml/l, y se incubaron durante 48 h a 43 °C en atmósfera microaerófila (N<sub>2</sub> 80%, CO<sub>2</sub> 10%, O<sub>2</sub> 5%, H<sub>2</sub> 5%). La identificación de familia y especie se realizó mediante las pruebas de oxidasa, catalasa, fermentación de hidratos de carbono, hidrólisis del hipurato, hidrólisis del indoxil acetato, sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina (discos de 30 µg). Para la biotipificación se realizaron las pruebas propuestas por Lior (11).

Las cepas utilizadas para la electroforesis fueron cosechadas en una solución salina de pH 7,0 a partir de placas de agar Brucella con 5% de sangre ovina, luego de una incubación de 48 h a 43 °C en microaerofilia. Las suspensiones bacterianas fueron lavadas 3 veces con la misma solución y posteriormente centrifugadas a 3500 rpm durante 20 min. Los sedimentos así obtenidos, formados por bacterias completas, fueron procesados en condiciones de reducción, hervidas a 100 °C durante 5 min y sembradas en geles de poliacrilamida al 7,5, 10 y 12,5%, empleando un sistema de buffer discontinuo. Las placas (170 x 190 x 1mm) se sometieron a 35 mA durante aproximadamente 3,5 h de acuerdo a la metodología utilizada por Brooks y col (5). Como cepa de referencia se utilizó la cepa *Campylobacter jejuni* ATCC 29428 y como marcador de peso molecular, un preparado proteico comercial (Pharmacia) que produce 6 bandas (94, 67, 43, 30, 20,1 y 14,4 kD). La tinción posterior de los geles se realizó con azul brillante de Coomassie.

## RESULTADOS

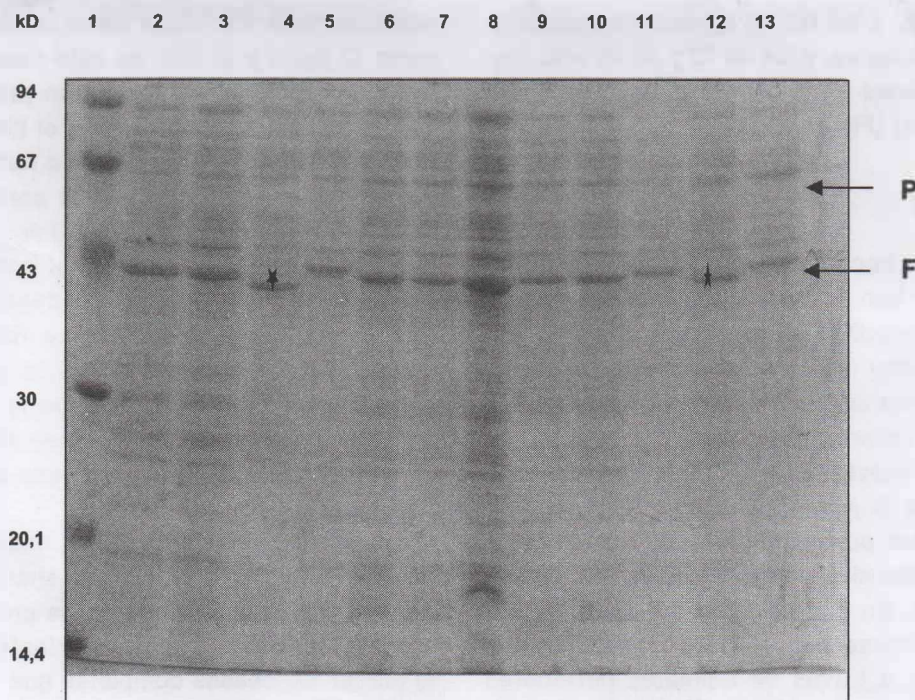
Se aislaron 11 cepas de *Campylobacter* a partir de 3 de los 8 establecimientos que remitieron

muestras de fetos suínos abortados. De ellas, 10 se identificaron como *C. jejuni*, de las cuales 3 fueron caracterizadas como biotipo I de Lior y 7 como biotipo II y una cepa como *C. coli* biotipo I.

**Cuadro 1.** Pruebas bioquímicas, de sensibilidad y crecimiento utilizadas para caracterizar las cepas de campilobacterias.

Cepa	Oxidasa	Catalasa	TSI <sup>1</sup>	IA <sup>2</sup>	NA <sup>3</sup>	CE <sup>4</sup>	Hipurato	SH <sub>2</sub> <sup>5</sup>	DNasa	Especie
1	+	+	-	+	R	R	+	-	+	<i>C. jejuni</i> II
2	+	+	-	+	R	R	+	-	+	<i>C. jejuni</i> II
3	+	+	-	+	S	R	+	-	-	<i>C. jejuni</i> I
4	+	+	-	+	S	R	+	-	-	<i>C. jejuni</i> I
5	+	+	-	+	R	R	+	-	+	<i>C. jejuni</i> II
6	+	+	-	+	R	R	+	-	+	<i>C. jejuni</i> II
7	+	+	-	+	S	R	-	-	-	<i>C. coli</i> I
8	+	+	-	+	R	R	+	-	+	<i>C. jejuni</i> II
9	+	+	-	+	R	R	+	-	+	<i>C. jejuni</i> II
10	+	+	-	+	S	R	+	-	+	<i>C. jejuni</i> II
11	+	+	-	+	R	R	+	-	+	<i>C. jejuni</i> II
ATCC	+	+	-	+	S	R	+	-	+	<i>C. jejuni</i> II

<sup>1</sup> TSI= triple sugar iron agar (fermentación de hidratos de carbono). <sup>2</sup> IA= hidrólisis del indoxil acetato. <sup>3</sup> NA= ácido nalidíxico. <sup>4</sup> CE=cefalotina. <sup>5</sup> SH<sub>2</sub>= prueba rápida de SH<sub>2</sub> de Lior



**Figura 1.** Perfiles proteicos de cepas de *Campylobacter* aisladas de fetos suínos. (gel 12,5%). 1= Marcador de peso molecular; 2= Cepa 1; 3= Cepa 2; 4= Cepa 3; 5= Cepa 4; 6= Cepa 5; 7= Cepa 6; 8= Cepa 7; 9= Cepa 8; 10= Cepa 9; 11= Cepa10; 12= Cepa11; 13= ATCC 29428 Cepa de referencia. \*= diferencias de movilidad. F= Flagelina. P= Porina. En este nivel se encuentran las mayores diferencias de movilidad.



El Cuadro 1 muestra el resultado de la caracterización fenotípica, así como la identificación y biotipo de Lior de las cepas aisladas.

Los tres establecimientos (a, b, c) de donde se aislaron campilobacterias pertenecieron a diferentes localidades. Las cepas denominadas 1, 2, 5, 6, 7, 8 y 9 se aislaron de diferentes brotes del establecimiento a, las cepas 3 y 4 (establecimiento b) de fetos de la misma camada y las cepas 10 y 11, de muestras remitidas con un año de diferencia, del establecimiento c y de madres distintas.

En todas las concentraciones de acrilamida ensayadas se encontraron las mismas variaciones en las mismas cepas. Todas las cepas aisladas mostraron las proteínas descriptas comunes a *C. jejuni* y *C. coli*, con algunas diferencias. La porina se encontró en todas las cepas en elevadas cantidades de acuerdo a la intensidad de la banda y presentó algunas diferencias de movilidad: fue más liviana en la cepa 3 (40 kD), que en las cepas 1, 2, 7 y 11 (41 kD), las cepas 5, 6, 8 y 9 (42 kD) y en las 4, 10 y ATCC (43 kD). La flagelina también se encontró en todas las cepas y sólo fue más liviana en la cepa 11 (60 kD). La bandas de 92 y 29 kD no presentaron variaciones entre las cepas, y las de 72 y 50 kD sólo fueron más livianas en la cepa 3 (70 y 48 kD, respectivamente) (Figura 1).

## DISCUSIÓN

Los especies bacterianas de la familia *Campylobacteraceae* han sido aisladas de casos de problemas reproductivos en suinos pertenecen al género *Arcobacter* (14), mientras que las especies termotolerantes del género *Campylobacter* se han aislado de rumiantes (bovinos y ovinos) pero no de cerdos. Nuestro estudio pudo corroborar la presencia de *C. jejuni* y *C. coli* en fetos de diferentes edades provenientes de diferentes granjas de cría intensiva y de localidades muy distantes entre sí. En cuanto al modo de infección, podría producirse por las heces de los cerdos colonizados, a través de animales portadores como los pájaros silvestres o bien por la contaminación del agua, como ha sido descrito en ovejas (8).

Hubo coincidencia de biotipo en los aislamientos realizados en una misma granja a pesar de

haberse realizado en distintos períodos durante el transcurso de la recepción de las muestras (febrero 2000-marzo 2001). En los establecimientos denominados a y c el biotipo identificado por el método de Lior fue el II, mientras que en el establecimiento b fue el I de Lior. Las cepas 3 y 4 aisladas de este último tuvieron diferencias en sus perfiles proteicos a pesar de compartir idénticas características fenotípicas.

Hay evidencias de que pueden coexistir cepas de *Campylobacter* con diferentes perfiles proteicos en el tracto digestivo de un mismo animal (19) y que las madres pueden albergar en las heces varios subtipos diferentes de campilobacterias que por las similitudes halladas en los tipos genotípicos, se corrobora posteriormente que los trasladan a sus hijos (24, 25). La experiencia realizada con cerdos gnotobióticos demuestran que estos animales nacen libres de *Campylobacter* pero que se infectan a los pocos días de nacidos (4). Este hecho justificaría las diferencias en los perfiles proteicos hallados en las cepas 3 y 4 que pertenecieron a fetos de una misma madre e igual camada.

Si bien se utilizaba la sensibilidad al ácido nalidíxico para identificar las especies sensibles como *C. jejuni* y *C. coli*, en este caso 63,6% de las cepas de *C. jejuni* resultaron resistentes, lo que no estuvo asociado ni con el biotipo ni con el origen de la muestra. Tampoco hubo una banda definida e identificada en la corrida electroforética que diferenciara esa característica, como lo hallaron Altwegg y col (2) al encontrar una banda de 50 kD ausente en las cepas con resistencia a este antibacteriano. La resistencia al ácido nalidíxico no es plasmídica sino cromosómica y es una emergencia de la resistencia antibiótica a las fluoroquinolonas en cepas de origen animal y humano registrada en la última década (1).

De acuerdo a la bibliografía consultada, las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* muestran una elevada relación antigénica con varias proteínas conservadas. Existe una zona importante de bandas al utilizar las células completas que se denomina "outer membrane proteins" –OMPs– que se restringe a una zona de entre 39 y 60 kD. Dentro de ella, existe un polipéptido mayor de 40-45 kD denominada proteína e –porina– que constituye el 90% del OMPs y el 50% del total de pro-

teína de la bacteria completa (21); cuatro proteínas menores constantes de 27-29, 35-40, 62-64 –flagelina–, y 72 kD y una menor variable de 70-75 kD (13, 26). Es de destacar que la proteína e se altera por diferentes condiciones de crecimiento e incubación, por repetidos pasajes en medios de cultivo o después de la infección en modelos de ratones o voluntarios humanos (21).

Si bien de las corridas de las proteínas de las cepas de campilobacterias aisladas se pudieron identificar bandas correspondientes a OMPs y la proteína e, el análisis numérico computarizado es el que permite evidenciar con más precisión las diferencias entre grupos y subgrupos dentro de este género bacteriano, más aún teniendo una base de datos de cada uno de los aislamientos que se realicen, como referencia (21). El método de electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando células completas resulta atractivo por su simpleza y por su bajo costo, genera perfiles estables y reproducibles aún en diferentes laboratorios, lo que se contrapone con las discrepancias obtenidas en la caracterización fenotípica entre distintos operadores (17).

A pesar de no realizar un dendograma, en el cual identificar las diferencias específicas entre las bandas de la región hipervariable densa por análisis numérico de las proteínas totales, se pudieron establecer diferencias en las corridas de proteínas de los aislamientos de fetos suinos abortados y corroborar que a pesar de tener características idénticas en sus fenotipos y biotipos las cepas aisladas mostraron diferencias en su patrón proteico, hecho que corrobora la variabilidad de los tipos involucrados y que compromete a un estudio más exhaustivo de la epidemiología de este género bacteriano.

## AGRADECIMIENTOS

M.G.E. es miembro del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aarestrup FA, Enberg J (2001) Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. Vet. Res. 32: 311-321.
2. Altewegg M, Burnens A, Zollinger-Iten J, Penner JL (1987) Problems in identification of *Campylobacter jejuni* associated with acquisition of resistance to nalidixic acid. J. Clin. Microbiol. 25: 1807-1808.
3. Blaser MJ (1983) Epidemiology of *Campylobacter* infection. Epidemiol. Rev. 5: 157-176.
4. Boosinger TR, Powe TA (1988) *Campylobacter jejuni* infections in gnotobiotic pigs. Am. J. Vet. Res. 49: 456-458.
5. Brooks B, Garcia M, Fraser DE, Lior H, Stewart B, Lammerding AM (1986) Isolation and characterization of cephalotin susceptible *Campylobacter coli* from slaughter cattle. J. Clin. Microbiol. 24: 591-595.
6. Diker KS, Istanbuloglu E (1986) Ovine abortion associated with *Campylobacter jejuni*. Vet. Rec. 118: 307.
7. Diker KS, Aydyn N (1988) Ovine abortion associated with *Campylobacter coli*. Vet. Rec. 122: 87.
8. Diker KS, Esendal OM, Akan M (2000) Epidemiology of ovine *Campylobacter* infection determined by numerical analysis of electrophoretic protein profiles. J. Vet. Med. B 47: 739-743.
9. Fernández H (1992) Evaluation of a blood-free selective medium for the isolation of thermotolerant *Campylobacter* species. Arq. Biol. Tecnol. 35: 91-97.
10. García MM, Eaglesome MD, Rigby (1983) *Campylobacters* important in veterinary medicine. Vet. Bull. 53: 793-818.
11. Lior H (1984). New extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *laridis*. J. Clin. Microbiol. 20: 636-640.
12. Moore WEC, Hash D.E, Holdeman LV, Cato EP (1980) Polyacrilamide slab gel electrophoresis of soluble proteins for studies of bacterial floras. Appl. Environ. Microbiol. 39: 900-907.
13. Newell DG, Mc Bride H, Pearson AD (1984) The identification of outer membrane proteins and flagella of *Campylobacter jejuni*. J. Gen. Microbiol. 130: 1201-1208.
14. Oliveira SJ, Bactz AL, Wesley IV, Harmon KM (1997) Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. Vet. Microbiol. 57: 347-354.
15. Oliveira SJ, Borowski SM, Barcellos DESN, Gomes Pereira MJ, Stepan AL (1995) Isolamento de *Arcobacter* (*Campylobacter*) *cryaerophila* de fetos suínos abortados. Ciencia Rural, Santa Maria. 25: 171-172.
16. On SLW, Holmes B (1991) Effect of inoculum size on the phenotypic characterization of *Campylobacter* species. J. Clin. Microbiol. 29: 1785-1788.
17. On, SLW (1986) Identification methods for *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms. Clin. Microbiol. Rev. 9: 405-422.
18. Skirrow MB (1994) Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. J. Comp. Pathol. 111: 113-149.
19. Stephen L, On W, Costas M, Holmes B (1993) Identification and intraspecific heterogeneity of *Campylobacter hyointestinalis* based on numerical analysis of electrophoretic protein profiles. System. Appl. Microbiol. 16: 37-46.
20. Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R, De Ley J (1991) Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy:

- emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. Int. J. System. Bact. 41: 88-103.
21. Vandamme P, Dewettinck D, Kersters K (1992) Application of numerical analysis of electrophoretic protein profiles for identification of thermophilic *Campylobacter*. System. Appl. Microbiol. 15: 402-408.
  22. Wang WL, Reller LB, Samalwood B, Luechtefeld NW, Blaser MJ (1983) Evaluation of transport media for *Campylobacter jejuni* in human fecal specimens. J. Clin. Microbiol. 18: 803-807
  23. Wassenaar TM, Newell DG (2000) Genotyping of *Campylobacter* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1-9.
  24. Weijtens MJB, van der Plas J, Bijer PGH, Urlings HAP, Koster D, van Logtestijn JG, *et al* (1997) The transmission of *Campylobacter* in piggeries, an epidemiological study. J. Appl. Microbiol. 83: 693-698.
  25. Weijtens MJB, Reinders RD, Urlings HA, van der Plas J (1999) *Campylobacter* infections in fattening pigs, excretion pattern and genetic diversity. J. Appl. Microbiol. 86: 1 63-70.
  26. Wenhman W, Chai J, Lovie TJ, Grandreau C, Lios D, Newell G, *et al* (1985) Antigenic analysis of *Campylobacter* flagellar protein and other proteins. J. Clin. Microbiol. 21: 108-112.

Recibido: 5/6/02 – Revisado: 4/9/02